

平成 16 及び 17 年度における北海道産加工食品中の アレルギー物質のモニタリング検査について

The Monitoring Test of Allergenic Materials in Process Foods
Produced in Hokkaido in Fiscal Years 2004 and 2005

兼俊 明夫 林 隆章 田沢悌二郎 加藤 芳伸
平間 祐志 藤本 啓 斉藤 明子 鈴木 智宏
孝口 裕一 小川 広

Akio KANETOSHI, Takaaki HAYASHI, Teijiro TAZAWA, Yoshinobu KATOH,
Yuji HIRAMA, Toru FUJIMOTO, Akiko SAITO, Tomohiro SUZUKI,
Hirokazu KOGUCHI and Hiroshi OGAWA

Key words : food allergy (食物アレルギー) ; process food (加工食品) ; ELISA (エライザ法) ; PCR
(PCR 法) ; western blotting (ウェスタンブロット法)

近年、乳幼時期におけるアトピー性皮膚炎の発症に食物アレルギーの関与が示唆される¹⁾など、食物アレルギーは深刻な社会問題となっている^{2,3)}。また、児童の成長期においては、必須栄養素の摂取が食物アレルギーのために抑制され、栄養障害につながる恐れが懸念されている⁴⁾。厚生労働省では研究班を組織し、その診断・予防法の確立に取り組んでいる⁵⁾。

平成 13 年 4 月、厚生労働省は、アレルギー物質を含む食品について、消費者の健康被害の発生を防止する観点から、特定原材料 5 品目（小麦、そば、落花生、卵、乳）を原材料として含む食品に対して、当該原材料を原料として含む旨の表示を行うことを義務化する通知⁶⁾を出した。さらに、平成 14 年 11 月には「特定原材料 5 品目を含む食品の検査法について」を通知⁷⁾した。

北海道は、平成 16 年度より、道内で製造された加工食品におけるアレルギー物質のモニタリング検査を実施している。今回、平成 16 年度及び 17 年度に実施した検査の結果をまとめたので報告する。

方 法

1. 試験品

平成 16 年度は、道立保健所管内にて製造された加工食品 38 検体を試買して試験品とした。平成 17 年度は、加工食品 35 検体を管内製造工場にて収去して試験品とした。これらの試験品の中で要冷凍・要冷蔵のものについては、温度記録装置を同封して搬送中の温度管理を行った。

2. ELISA 測定用キット

特定原材料 5 品目（小麦、そば、落花生、卵、乳）の混入の有無を判定する一次スクリーニング法には、これらの精製タンパク質もしくは複合タンパク質を抗原として作成された抗体を使用した ELISA 法を用いた。平成 16 年度の一次スクリーニング試験には、厚生労働省通知による検査法⁷⁾（以下通知法と略）に記載されている森永生科学研究所製モリナガ特定原材料測定キット（小麦グリアジン、そば、落花生、卵白アルブミン及びカゼイン）及び日本ハム（株）中央研究所製 FASTKIT エライザシリーズキット（小麦、そば、落花生、卵及び牛乳）を用いた。平成 17 年度での卵、乳の検査には改良検査法⁸⁾として新たに追加されたモリナガ FASTPET 特定原材料測定キット（卵白アルブミン、カゼイン）及び日本ハム FASTKIT エライザ Ver.-II シリーズキット（卵、牛乳）を用いた。

3. 試料溶液の調製及び測定法

試料溶液の調製と測定は通知法⁷⁾に従って行った。最初に試験品をフードプロセッサー（松下産業（株）製、MK-K 78）またはホモジナイザー（日本精機（株）製、AM-11）を用いて均質化した。均質化した試料約 2 g を精秤し、38 mL の抽出液（ELISA キット付属液を希釈して調製）を加えて pH を 6.0～8.0 に調整し、ミルサー（岩谷産業（株）製、IFN-700 G）で、30 秒間×3 回攪拌して抗原タンパク質の抽出操作を行った。

平成 17 年度の乳及び卵の検査では、改良検査法⁸⁾（モリナガ FASTPET エライザシリーズキット⁹⁾）及び日本ハム

FASTKIT エライザ Ver.-II シリーズキット) を用いたため、均質化した試料約 1g を 50 mL の共栓付きディスポーザブル遠沈管に精秤し、19 mL の抽出液(新 ELISA キットの 3 液を混合して調製)を加えて pH を 6.0~8.0 に調整後、水平状態に固定し、1 分間あたり 90~110 往復、室温(20~25°C)で 18~20 時間振とうして抗原タンパク質の抽出操作を行った。

抽出液は遠心分離(3000×g, 20 分間)し、上清をろ紙(5 A, 110 mm)でろ過して試料溶液とした。さらに、試料溶液は、森永生科学研究所製 ELISA キットでは 40 倍に、日本ハム(株)中央研究所製 ELISA キットでは 20 倍にそれぞれ希釈し、ELISA 法用 96 穴マイクロプレートに負荷した。マイクロプレートには、1 次抗体、2 次抗体、発色基質などを順次反応させ、バイオ・ラッド社製 Foodmark マイクロプレートリーダーにて吸光度測定を行い、4 係数 Logistic 解析用データ解析ソフト Foodmark Software にて特定原材料由来タンパク質含有量を算出した。特定原材料由来のタンパク質含有量が、検量線下限値(モリナガ:0.4 µg/g, 日ハム:0.2 µg/g)未満を「検出せず」とし、10 µg/g 以上を「陽性」と判定した。

4. 確認試験法

一次スクリーニング試験の ELISA 法にて、10 µg/g 以上の特定原材料由来タンパク質の混入が認められた試験品については確認試験を行うこととされている。確認試験法として、小麦、そば、落花生については PCR 法が、卵、乳にはウェスタンブロット法が指定されている。

(1) PCR によるそばの確認試験法

均質化した試料約 2g を精秤し、CATB 法により DNA を抽出した。PCR 反応には、DNA 抽出の可否を判定するために植物 DNA 増幅プライマーセット(オリエンタル酵母工業(株)製)と Ampli Taq Gold (Applied Biosystems 社製)を、またそば遺伝子確認用プライマーキットとしてオリエンタル酵母工業(株)製キットをそれぞれ使用した。また、標準試料はそば遺伝子確認用キットに付属していたものを用いた。DNA 増幅のための反応液は、最終濃度が 1×PCR Buffer, 1.5 µM MgCl₂, 0.2 µM dNTPs, 0.2 nM センスプライマー, 0.2 nM アンチセンスプライマー, Ampli Taq Gold 0.625 Units, DNA 1 ng/µL となるように調製した。PCR 反応は、95°C 10 分間保持後、95°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 1 サイクルとして 40 サイクル、最後に 72°C 7 分間の条件で行った。

(2) ウェスタンブロット法による乳、卵の確認試験法

乳の確認試験には 2 種のモリナガ牛乳ウェスタンブロットキット(カゼイン及びラクトグロブリン)を、卵の確認試験には 2 種のモリナガ卵ウェスタンブロットキット(オボムコイド及びオボアルブミン)を使用した。試料溶液は「3. 試料溶液の調製及び測定法」の項で得られたものを希釈せずにそのまま用いた。

試料溶液 100 µL にローディングバッファー(和光純薬工業(株)製、×2 倍濃度を希釈して使用) 200 µL を加えて、

よく攪拌した後、100°C で 5 分間加熱した。冷却後その 20 µL をテフコ製 15% SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、定電流・定電圧電源(BIOCRAFT(株)製, BP-550)を用いて 20 mA の定電流で電気泳動(泳動装置: テフコ(株)製, STC-808)を行った。泳動後ゲルはアマシャム・バイオサイエンス社製 PVDF 膜 Hybond-P に重層し、転写装置(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)製 TRANS-BLOT SD または テフコ(株)製 STB-88)を用いて、PVDF 膜 1 cm² あたり 2 mA の電流値で 1 時間転写を行った。転写した PVDF 膜には、モリナガ製ウエスタンブロットキットの 1 次抗体溶液(終濃度 0.5 µg/mL)、2 次抗体溶液(VECTOR 社製, VECTASTAIN ABC-AP Rabbit IgG kit のビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体を 10000 倍に希釈したもの)、アルカリホスファターゼ標識アビジン-ビオチン溶液(VECTOR 社製, VECTA-STAIN ABC-AP Rabbit IgG kit)、検出試薬(VECTOR 社製 Alkaline Phosphatase Substrate Kit IV <BCIP/NBT>)を順次反応させ、免疫染色を行った。

同じゲル上に、キットに付属の標準試料溶液(タンパク質濃度 10, 1.0 及び 0.5 µg/mL)をアプライし、同様に操作した後、標準品と同じ分子量位置に明瞭なバンドを認めた場合を「陽性」とした。

結果及び考察

平成 16 年度に検査を実施した 38 検体の試験結果を表 1 に示した。ELISA 法による一次スクリーニング試験の結果、小麦、そば、落花生の検査対象となった 23 検体では、陽性と判定される特定原材料由来タンパク質含有量がどちらかのキットで 10 µg/g 以上を示すものは認められなかった。しかし、表 1 に示したように、No.4「洋菓子」の 1 検体から小麦タンパクが 2 種類のキットでそれぞれ 2.3, 0.8 µg/g の値で、また、生ラーメン及びゆでうどんの 3 検体でも同様に、2 種類のキットでそばタンパクが 0.7~7.0 µg/g の値で検出され、小麦タンパクやそばタンパクの微量な混入が疑われた。

一方、ソーセージ類やパンの検体の中には、ELISA 法で 10 µg/g 以上の乳タンパクが混入しているものが認められた。乳タンパクの混入が認められた 2 検体は、2 種類の抗原タンパクに対するウェスタンブロット法による確認試験でも、それぞれ陽性となった。その結果を図 1(カゼイン)及び 2(ラクトグロブリン)に示した。この 2 検体の製造所を所管する保健所による調査の結果、No.26「ポロニアソーセージ」には、脱脂粉乳の使用が明らかとなり、直ちに自主回収された。また、No.30「パン」については、原材料に乳成分を含むファットスプレッド(食用油脂を脱脂粉乳などを用いて乳化したもの)が使用されており、本食品素材が乳タンパク陽性の原因と考えられた。

平成 17 年度は表 2 に示した食品について検査を行った。小麦、そば、落花生の検査対象である 21 検体の中で、16 年度の検査と同様に、生ラーメン及びうどん中にはそばタ

表1 平成16年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験 (PCR 法)	備 考
			モリナガ	日ハム		
1	グミキャンディ	小 麦	ND	ND	—	
2	焼き肉のたれ	小 麦	ND	ND	—	
3	スナック菓子	小 麦	ND	ND	—	
4	洋菓子	小 麦	2.3	0.8	—	
5	生菓子	小 麦	ND	ND	—	
6	いか塩辛	小 麦	ND	ND	—	
7	いか塩辛	小 麦	ND	ND	—	
8	いか塩辛	小 麦	ND	ND	—	
9	生ラーメン	そば	0.7	2.2	—	
10	ゆでうどん	そば	ND	0.9	—	
11	ゆでうどん	そば	ND	ND	—	
12	ゆでうどん	そば	3.2	7.0	—	
13	ゆでうどん	そば	ND	ND	—	
14	生ラーメン	そば	3.5	3.2	—	
15	ゆでうどん	そば	ND	ND	—	
16	生ラーメン	そば	ND	0.4	—	
17	アイスクリーム	落花生	ND	0.4	—	
18	アイスクリーム	落花生	ND	ND	—	
19	焼菓子	落花生	ND	2.2	—	
20	菓子	落花生	ND	ND	—	
21	クッキー	落花生	ND	ND	—	
22	生菓子	落花生	ND	ND	—	
23	菓子	落花生	ND	6.8	—	

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験(ウェスタンブロット法)		備 考
			モリナガ	日ハム	1	2	
24	ミニポークウインナー	乳	ND	ND	—	—	
25	ポロニアソーセージ	乳	>256	677	陽性	陽性	脱脂粉乳含有*
26	スモークソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
27	フランクフルトソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
28	ポークウインナーソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
29	かまぼこ	乳	ND	ND	—	—	
30	パン	乳	>25.6	22.2	陽性	陽性	ファットスプレッド含有**
31	ロースハム	乳	ND	ND	—	—	
32	まんじゅう	卵	ND	0.3	—	—	
33	ポークソーセージ	卵	ND	ND	—	—	
34	コロッケ	卵	ND	ND	—	—	
35	ロースハム	卵	ND	ND	—	—	
36	魚肉ねり製品	卵	ND	ND	—	—	
37	食肉加工品	卵	ND	0.4	—	—	
38	コロッケ	卵	ND	ND	—	—	

乳の確認試験1：カゼイン， 確認試験2：ラクトグロブリン

卵の確認試験1：オボアルブミン， 確認試験2：オボムコイド

* No.25 は原材料表示の記載もれ，保健所の指導により自主回収された。

**ファットスプレッド：食用油脂を脱脂粉乳などで乳化したもの。

ND：モリナガ0.4 $\mu\text{g/g}$ 未満，日ハム0.2 $\mu\text{g/g}$ 未満，—：試験せず。

ンパクの混入が疑われるものが7検体認められた。それらの混入タンパクの値は0.3～9.7 $\mu\text{g/g}$ であった。これらの検体の中で，9.7 $\mu\text{g/g}$ の値を示したNo.8の検体は，そばタンパクが10 $\mu\text{g/g}$ 以上（小数点1桁四捨五入）の値で検出されたことになるので，PCR法による確認試験を行った。図3に示した様に，No.8の検体にはPCR法に

よりそば遺伝子の混入が確認された。この検体には「当工場ではそばを含む製品を製造しております」という記載があり，製造所を所管する保健所の調査から，製造工程におけるコンタミネーションが原因であると推定された。

さらに，No.26「焼菓子」には微量の乳タンパクの混入が疑われたほか，No.30「ビーフハム」とNo.32「なる

表2 平成17年度アレルギー物質モニタリング検査結果

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験 (PCR 法)	備 考
			モリナガ	日ハム		
1	魚肉練り製品	小麦	1.7	0.6	—	
2	ローストチキンハム	小麦	ND	ND	—	
3	洋生菓子	小麦	ND	ND	—	
4	魚肉練り製品	小麦	ND	ND	—	
5	和菓子	小麦	ND	ND	—	
6	そうざい	小麦	ND	ND	—	
7	冷凍食品	小麦	ND	ND	—	
8	生ラーメン	そば	2.2	9.7	陽性	注意記載あり*
9	生ラーメン	そば	1.5	6.6	—	
10	即席カップ麺	そば	ND	ND	—	
11	生ラーメン	そば	2.6	7.0	—	
12	ゆでうどん	そば	ND	0.8	—	
13	生ラーメン	そば	3.6	6.1	—	注意記載あり*
14	半生うどん	そば	0.8	1.8	—	
15	生ラーメン	そば	ND	0.3	—	注意記載あり*
16	アイスクリーム	落花生	ND	ND	—	
17	アイスクリーム	落花生	ND	ND	—	
18	洋菓子	落花生	ND	ND	—	
19	パン	落花生	ND	ND	—	
20	焼菓子	落花生	ND	0.9	—	
21	生菓子	落花生	ND	ND	—	

No.	名 称	特定原材料	ELISA 試験($\mu\text{g/g}$)		確認試験(ウェスタンブロット法)		備 考
			モリナガ	日ハム	1	2	
22	ポークウインナーソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
23	フランクフルトソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
24	フランクフルトソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
25	つくだ煮	乳	ND	ND	—	—	
26	焼菓子	乳	ND	0.4	—	—	
27	ポークソーセージ	乳	ND	ND	—	—	
28	サケフレーク	卵	ND	ND	—	—	
29	食パン	卵	ND	ND	—	—	
30	ビーフハム	卵	>400	>200	陽性	陽性	表示あり**
31	油菓子	卵	ND	ND	—	—	
32	なると	卵	85	71	陽性	陽性	表示なし***
33	ロースハム	卵	0.5	ND	—	—	
34	ギョウザの皮	卵	ND	ND	—	—	
35	なると	卵	1.4	ND	—	—	

乳及び卵の ELISA 試験：改良検査法⁹⁾ キット（モリナガ FASTPET，日ハム Ver.II）を使用。

乳の確認試験 1：カゼイン， 確認試験 2：ラクトグロブリン

卵の確認試験 1：オボアルブミン， 確認試験 2：オボムコイド

* No.8, 13, 15 については、「当社工場ではそばを含む製品を製造しております」旨の表記あり。

** No.30 は原材料表示に「卵」の記載有り。

***No.32 は製造工程での夾雑。保健所からの指導により自主回収された。

ND：モリナガ 0.4 $\mu\text{g/g}$ 未満，日ハム 0.2 $\mu\text{g/g}$ 未満，—：試験せず。

と」の 2 検体では、卵タンパクの混入が認められ、2 種類の ELISA 法でそれぞれ、>400、>200 $\mu\text{g/g}$ 及び 85、71 $\mu\text{g/g}$ の値を示した。2 検体が ELISA 法で 10 $\mu\text{g/g}$ 以上の混入を示したことから、ウェスタンブロット法による確認試験を行った。図 4 には両試料のウェスタンブロット法によるオボアルブミンの確認試験結果を、図 5 にはオボムコイドの確認試験結果を示した。No.30 及び No.32 の 2

検体ともに、オボアルブミン及びオボムコイド両タンパクの混入が認められた。No.30「ビーフハム」には原材料表示に「卵」の記載があったため、表示上の問題は全くなく、陽性コントロールとして検査を行った。しかし、No.32「なると」には「卵」の表示が無く、製品は直ちに自主回収された。

平成 16 年度と 17 年度の検査結果を見ると、陽性と確認

された事例は、表示義務に対する認識の欠如や製造工程におけるコンタミネーションによるものであった。特に、生ラーメンやうどん類では微量なそばタンパクの混入が疑われるような検体が見受けられた。麺類の製造では製造工程が同一である場合、そば粉の混入が危惧される報告¹⁰⁾があること、そばアレルギーは乳アレルギーに比較すると重篤な症状を呈すること¹¹⁾から、小麦製品とそば製品を同時に扱う麺製造所では、微量混入による食物アレルギー事

故を回避するために、製造ラインを分離することや洗浄に十分な注意を払う必要がある。また、コンタミネーション防止対策の徹底を図ってもなお、その可能性が排除できない場合については注意を喚起する旨の表示を記載することが望ましいといえる。

以上のことから、製造者は製品の安全性管理の面から、表示義務に対する注意の喚起、製造工程の分離・洗浄、原材料のトレーサビリティ（追跡管理）の徹底を図ること

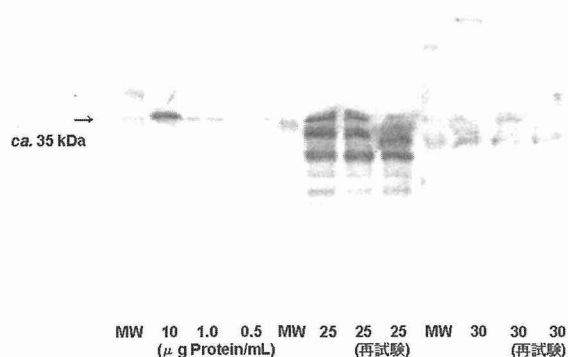


図1 ウェスタンブロット法による乳の確認試験
(カゼイン)

レーンMW：分子量マーカー，レーン10，1.0，0.5：乳標準試料10，1.0及び0.5 μ gタンパク/mL（各20 μ Lアプライ），レーン25：試料No.25及びNo.25再試験（各20 μ Lアプライ），レーン30：試料No.30及びNo.30再試験（各20 μ Lアプライ）

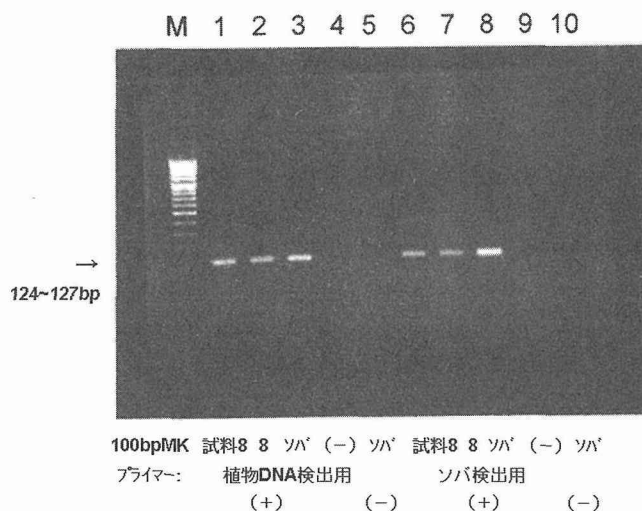


図3 PCR法によるそばの確認試験

レーンM：100 bp マーカー，レーン1及び2：試料8 DNA+植物DNA検出用プライマー，レーン3：そば標準試料DNA+植物DNA検出用プライマー，レーン4：植物DNA検出用プライマーのみ，レーン5：そば標準試料DNAのみ，レーン6及び7：試料8 DNA+そばDNA検出用プライマー，レーン8：そば標準試料DNA+そばDNA検出用プライマー，レーン9：そばDNA検出用プライマーのみ，レーン10：そば標準試料DNAのみ

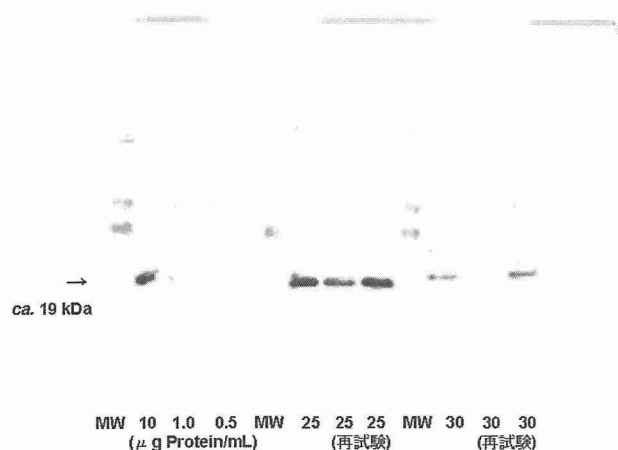


図2 ウェスタンブロット法による乳の確認試験
(ラクトグロブリン)

レーンMW：分子量マーカー，レーン10，1.0，0.5：乳標準試料10，1.0及び0.5 μ gタンパク/mL（各20 μ Lアプライ），レーン25：試料No.25及びNo.25再試験（各20 μ Lアプライ），レーン30：試料No.30及びNo.30再試験（各20 μ Lアプライ）

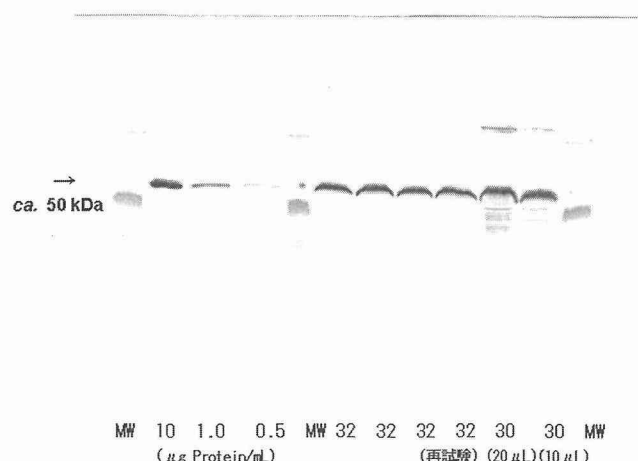


図4 ウェスタンブロット法による卵の確認試験
(オボアルブミン)

レーンMW：分子量マーカー，レーン10，1.0，0.5：卵標準試料10，1.0及び0.5 μ gタンパク/mL（各20 μ Lアプライ），レーン32：試料No.32及びNo.32再試験（各20 μ Lアプライ），レーン30：試料No.30（20 μ Lアプライ）及び試料No.30（10 μ Lアプライ）

→
37~38 kDa

MW 10 1.0 0.5 MW 32 32 32 32 30 30 MW
(μ g Protein/mL) (再試験) (20 μ L) (10 μ L)

図5 ウェスタンブロット法による卵の確認試験
(オボムコイド)

レーン MW：分子量マーカー，レーン 10, 1.0, 0.5：卵標準試料
10, 1.0 及び 0.5 μ g タンパク/mL (各 20 μ L アプライ)，レーン 32
：試料 No.32 及び No.32 再試験 (各 20 μ L アプライ)，レーン 30：
試料 No.30 (20 μ L アプライ) 及び試料 No.30 (10 μ L アプライ)

が必要となる。さらには、消費者が適正な判断を下せるよ
うなきめ細かい表示を行うことが求められると考える。

本モニタリング検査において、試料採取にご協力を頂き
ました北海道保健福祉部保健医療局食品衛生課及び道立保
健所の関係各位に深謝いたします。

- 1) 池松かおり，田知本寛，杉崎千鶴子，宿谷明紀，海老澤元
宏：アレルギー，55，140 (2006)
- 2) 丸井英二：保健の科学，45，156 (2003)
- 3) 林 隆章：しゃりばり，288，60 (2006)
- 4) 佐藤千鶴子，斉藤明子，橋本 諭，平川由紀子，大瀬真知
子，縄井詠子，安達邦子，澤田扶美代，貝田富子，川田美
恵子，我妻義則：道衛研所報，51，32 (2001)
- 5) 海老澤元宏：アレルギー，55，107 (2006)
- 6) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第 79 号「食品衛
生法施行規則及び乳製品の成分規格に関する省令の一部を
改正する省令等の施行について」，平成 13 年 3 月 15 日
(<http://www.whoirei.mhlw.go.jp>)
- 7) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知食発第 1106001 号「ア
レルギー物質を含む食品の検査法について」，平成 14 年
11 月 6 日 (<http://www.whoirei.mhlw.go.jp>)
- 8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食発第 1011002 号
「アレルギー物質を含む食品の検査法について (一部改
正)」，平成 17 年 10 月 11 日 (<http://www.whoirei.mhlw.go.jp>)
- 9) Watanabe Y, Aburatani K, Mizumura T, Sakai M,
Muraoka S, Mamegosi S, Honjoh T: J. Immunol.
Methods, 300, 115 (2005)
- 10) 扇谷陽子，坪井 弘，大川一美，藤田晃三：第 42 回全国
衛生化学技術協議会年会講演集，126 (2005)
- 11) 上野川修一：乳の科学，朝倉書店，東京，2001，p.137